

## **EFEITO ANTITUMORAL DA CAFEÍNA COMO ANTAGONISTA DO RECEPTOR A2A EM CÉLULAS DE MELANOMA B16F10<sup>1</sup>**

**Jean Lucas Gutknecht da Silva<sup>2</sup>, Altevir Rossato Viana<sup>3</sup>, Luciana Maria Fontanari Krause<sup>4</sup>, Daniela Ferreira Passos<sup>5</sup>, Daniela Bitencourt Rosa Leal<sup>6</sup>**

<sup>1</sup> Pesquisa Institucional desenvolvida no Laboratório de Imunobiologia Experimental e Aplicada, Programa de Pós-Graduação Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria.

<sup>2</sup> Programa de Pós Graduação Ciências Biológicas Bioquímica Toxicológica

<sup>3</sup> Programa de Pós Graduação em Nanociências UFN

<sup>4</sup> Programa de Pós Graduação em Nanociências - UFN

<sup>5</sup> Programa de Pós Graduação Ciências Biológicas Bioquímica Toxicológica

<sup>6</sup> Professor Orientador - Programa de Pós Graduação Ciências Biológicas Bioquímica Toxicológica

### **INTRODUÇÃO**

O melanoma está entre as neoplasias mais agressivas, apresentando-se com alta complexidade e heterogeneidade. Embora o melanoma primário exiba uma alta taxa de sobrevivência, o câncer melanoma metastático (MM), a forma mais agressiva desse câncer de pele, está associado a uma baixa taxa de sobrevida, sendo responsável por mais de 80% das mortes relacionadas ao câncer de pele (Siegel, Miller e Jemal, 2017).

Embora múltiplos fatores possam influenciar na susceptibilidade para o desenvolvimento do melanoma, o principal parâmetro é a exposição aos raios ultravioleta (UV). Os raios UV causam danos aos ácidos nucleicos e morte celular, liberando padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) dando início a uma resposta imunológica local (Emri *et al.*, 2018). Moléculas como os nucleotídeos de adenina (ATP, ADP e AMP) funcionam como DAMPs, e após liberadas por células imunes desempenham papel central na sinalização do processo inflamatório (Zimmermann, Zebisch e Sträter, 2012).

Dentre os muitos papéis fisiológicos e patológicos que sinalização purinérgica possa ser atribuída, o câncer vem ganhando destaque quanto ao potencial terapêutico que os componentes do sistema purinérgico possam desempenhar. O sistema purinérgico é constituído por nucleotídeos e o nucleosídeo da adenina e suas ações através das ligação aos receptores purinérgicos (purinoreceptores) na superfície celular e ao controle de suas ações pelas enzimas purinérgicas (Virgilio, Di *et al.*, 2001).

Elevadas concentrações de nucleotídeos da adenina são encontradas no meio extracelular como consequência de lesão ou estresse celular/tecidual. Os nucleotídeos, ATP e ADP, servem como

mediadores capazes de modular o processo de inflamação. O ATP, é uma molécula com atividade pró-inflamatória envolvida na indução de resposta imune e na resposta antitumoral. Quando no meio extracelular cada nucleotídeo vai desempenhar sua ação biológica através de receptores específicos, denominados receptores purinérgicos P2 e P1. (Garcia *et al.*, 2011; Virgilio, Di *et al.*, 2001).

Os efeitos dos nucleotídeos e nucleosídeo da adenina são regulados por meio das enzimas que os hidrolisam no meio extracelular, as ectonucleotidases CD39, CD73 e E-ADA (Zimmermann, 2012). Estas enzimas atuam formando uma cadeia enzimática que tem início com a ação da E-NTPDase (CD39) que catalisa a hidrólise do ATP e do ADP, formando AMP. A seguir a enzima CD73 hidrolisa a molécula do AMP formando adenosina (ADO) (Zimmermann, Zebisch e Sträter, 2012). Ainda, a enzima E-ADA, regula as concentrações de adenosina, através da desaminação e formação de inosina (Bours *et al.*, 2006; Zimmermann, 2000).

O microambiente tumoral contém altos níveis de adenosina (Blay, White e Hoskin, 1997) a qual é liberada e produzida em resposta a hipóxia do tecido tumoral, pela degradação de ATP pela via CD39/CD73, além de mudanças metabólicas na célula que promovem sua liberação. Sugerindo que as células tumorais podem se beneficiar do efeito imunossupressor da adenosina. Os receptores de adenosina (P1) são divididos em quatro membros, A1, A2A, A2B e A3. O receptor de adenosina A2A (A2AR) é o subtipo predominantemente expresso na maioria das células imunológicas (Fredholm *et al.*, 2001).

No microambiente tumoral (TME) a ligação de ADO ao receptor A2A (A2AR) funciona como um ponto operacional de verificação imune, causando efeito inibitório nas células imunes que a expressam, além de causar efeito direto na estimulação de sobrevivência e proliferação tumoral (Zarek *et al.*, 2008). Dessa forma, CD39/CD73 > ADO pode ser um checkpoint imune que controla as ações pela expressão de dessas enzimas e o receptor A2A nas células T de vigilância e tumorais levando a um perfil imunossupressor. Assim sendo, o bloqueio de alguma dessas vias seria uma estratégia imunoterapica eficaz contra o câncer (Young *et al.*, 2014).

Como mencionado acima, A2AR é expresso e exerce ações imunossupressoras em diversas células imunes. Utilizar A2R é, portanto, uma estratégia para melhorar as respostas imunes contra um tumor. Vários estudos demonstraram que a administração de antagonistas A2A pode aumentar a resposta imunológica a um tumor, induzindo apoptose e reduzindo metástase (Beavis *et al.*, 2013, 2015; Ohta *et al.*, 2006)

Vários fatores nutricionais relatam efeitos preventivos ou protetores contra o melanoma, estudos epidemiológicos determinaram associações entre o consumo de café cafeinado com a diminuição do

risco de MM (Liu *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2015). No entanto, tais resultados não são encontrados quando se é consumido o café descafeinado, assim o efeito protetivo é provavelmente devido ao componente cafeína (Lofffield *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2015).

A cafeína é capaz de inibir as ações da adenosina nos receptores A1, A2A e A2B com uma potência de poucos  $\mu\text{mol/L}$ . Em contraste, as ações da adenosina no receptor A3, são bloqueadas apenas em concentrações de aproximadamente 100  $\mu\text{mol/L}$  (Fredholm *et al.*, 2001), sendo este último, menos expresso nas células imunológicas. Presume-se que as ações primárias da cafeína sejam devido à inibição dos receptores A2A e A1 e nos locais onde esses receptores sejam expressos em quantidade suficiente para sejam ativados por baixas concentrações fisiológicas de adenosina (Fredholm, 2015). Portanto, sabendo que a cafeína é um inibidor não seletivo de A2A, e que esta já demonstrou efeitos protetores contra o melanoma, nós pretendemos avaliar os efeitos da cafeína sob as células de melanoma B16F10 estimuladas com adenosina.

## **METODOLOGIA**

**Agentes farmacológicos:** Cafeína (Sigma®) usada como antagonista não seletivo de receptores do tipo P1.

**Linhagem células:** A linhagem de melanoma metastático murino B16F10 foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro, BCRJ. Cultivada em meio Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) com 10% (v/v) soro fetal bovino com penicilina/estreptomicina (100 U/L) (Sigma®) em uma atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>.

**Tratamentos celulares:** As células B16F10 foram expostas a concentrações crescentes de ADO (0.1, 1, 10, 25, 50, 100, and 250  $\mu\text{M}$ ) e CAF (0.0375, 0.075, 0.150, 0.3, 0.6, 1.2, 2.4  $\mu\text{M}$ ), os controles continham PBS.

**Ensaio de viabilidade/citotoxicidade/atividade metabólica:** Para obter os valores de IC<sub>50</sub> foi usado o método do MTT 3(4,5-dimethyl)-2,5diphenyltetrazolium bromide (Sigma®) em  $5 \times 10^3$  cells/poço como descrito por Mosmann, 1983 (Mosmann, 1983).

**Determinação de óxido nítrico ON:** A produção de ON foi determinada usando o reagente de Griess. Foi 100uL do sobrenadante com o reagente e foi lido espectrofotometricamente a uma DO 540nm, a quantidade em uM de ON foi calculada por meio de uma curva padrão de nitrito de sódio.

**Ensaio de migração:** Foi utilizado o ensaio scratch wound assay (do inglês: ensaio de cicatrização de ferida), como descrito por Bul'rk (1973) (Bürk, 1973) com modificações. O ensaio consiste em fazer uma "ferida" na placa de cultura e avaliar a migração das células ocupando o espaço como

uma “cicatrização”. Ensaio utilizado para avaliar a capacidade metastática de linhagens tumorais em invadir novos espaços.

**Análise estatística:** Foi utilizado o software GraphPad Prism 7 (San Diego, USA); realizando o ensaio estatístico de ANOVA de uma ou duas vias seguido de post hoc Bonferroni’s para indicar a diferença entre os grupos. Os dados foram expressos em media mais desvio padrão da média  $\pm$  SD e foi considerado significativo um valor de  $P * P < 0.05$ ,  $** P < 0.01$ , e  $*** P < 0.001$ , respectivamente para com o controle e  $P ^+ P < 0.05$ ,  $^{++} P < 0.01$ , e  $^{+++} P < 0.001$ , para com os tratamentos.

## RESULTADOS

### **Figura 1. Ensaio de viabilidade celular. Tempo x Concentração de ADO**

Recriamos o TMA pela presença do nucleosídeo adenosina (ADO), assim expomos as células B16F10 a concentrações crescentes de ADO, pelo período de 24h e 72h de tratamento, Figura 1. O tratamento com ADO demonstrou diferença quanto ao período e a concentração da exposição, apresentando efeito dual. As células B16F10 quando expostas a ADO tiveram significativo aumento de viabilidade após 24h de exposição desde as dosagens mais baixas até atingir um máximo em 100uM e 67% a mais de células viáveis ( $P < 0,001$ ). O período mais prolongado de exposição, 72h, demonstrou no geral redução das células viáveis contudo as reduções não foram significativas, tal divergência deve estar relacionada a degradação da ADO pela enzima E-ADA, a qual é presente nas células B16F10, sendo assim ADO em menores períodos tem efeito pró tumoral até ser degradada.

### **Figura 2. Estimulação de B16F10 por ADO e bloqueio com CAF**

Quando expostas somente a cafeína as células de melanoma reduziram significativamente sua viabilidade, o IC50 calculado para CAF foi de 0,486uM. As células estimuladas com a concentração ótima de ADO (100uM) obtidas no experimento anterior foram testadas quanto ao bloqueio por CAF e obtivemos como resultado não somente a prevenção do estímulo por ADO, mas redução das células viáveis ( $P < 0,01$ ), vale ressaltar que embora estes estudos sejam conduzidos *in vitro* a concentração na qual atingimos o IC50 e o bloqueio na estimulação das células tumorais pela cafeína se apresentam em valores atingíveis em concentração plasmática humana.

### **Figura 3. Produção de Oxido Nítrico**

Testamos se as células B16F10 sofriam estímulo ou inibição da produção do composto oxido nítrico quando expostas a ADO e a CAF. A molécula de oxido nítrico (ON) apresenta diversas vias bioquímicas de formação bem como vários vieses de funções efetoras. No contexto de formação tumoral numerosos estudos discutem o papel do ON quanto a funções pró ou anti tumorais em diversas linhagens e modelos experimentais, para tal as conclusões apontam que concentrações médias a baixas de ON parecem estimular a formação tumoral, auxiliando na expansão de células tumorais, aumento de viabilidade, aumento da capacidade proliferativa e metastática, contudo quando encontrado em concentrações mais elevadas está relacionado a morte direta por apoptose e

estímulo das células imunes residentes do TMA contra o tumor.

Nossos resultados apontam que a exposição das células B16F10 a ADO gera aumento leve na concentração de ON, embora não significativo. Já, quando tratamos as células de melanoma com CAF ou mesmo estimulando-as com ADO e tratando com CAF ocorre um aumento expressivo na produção endógena de ON ( $P < 0,001$ ), tais resultados reafirmam e apontam possível mecanismo para redução de viabilidade o visto na Figura 1.

#### **Figura 4. Avaliação da Migração das células B16F10**

O processo metastático tumoral envolve muitos fatores sendo a capacidade de migração fundamental para o sucesso de propagação das células tumorais para além dos locais de origem. O ensaio de cicatrização de ferida nos dá uma ideia visual sobre como ocorre tal processo, e além disso se podemos retardar ou diminuir esta característica.

Na Figura 4 as áreas centrais marcadas inferem ao local aonde ocorreu a retirada de células, e após o período de exposição aos compostos(12h) podemos ver alteração na migração das células ao local original. Primeiramente podemos ter confirmação visual do obtido no resultado da figura 2, mesmo em período reduzido, a confluência das células tratadas com CAF é menor que o controle, e as estimuladas com ADO+CAF mesmo sendo menor que o controle se apresentam maiores que as sem estimulação por ADO.

As células de controle não foram afetadas pela ferida, migrando ao local de origem e praticamente ocupando todo o poço da placa. Já nas células expostas ao tratamento com CAF ou mesmo ADO+CAF vemos dificuldade dessas células em migrarem para o local de ferida. Podemos notar que o espaço da ferida no tratamento com exposição a ADO é menor que CAF, nos indicando que houve tentativa de migração estimulada pela ADO, mas antagonizada pela CAF. Já as células tratadas com CAF o processo de migração das células parece estar bloqueado.

#### **DISCUSSÃO**

O câncer de pele é considerado o mais prevalente no mundo, correspondendo a um em cada três cânceres diagnosticados. Embora tumores não-melanoma sejam os mais comuns os do tipo

melanoma corresponde a maioria das mortes. Sabe-se que a hipóxia do TMA bem como a liberação de mediadores inflamatórios geram um aumento significativo nos níveis peritumorais de ATP o qual é degradado a adenosina (Vijayan *et al.*, 2017). A ADO agindo diretamente nas células tumorais promove crescimento, sobrevivência, angiogênese, quimiorresistência e metástase (Scheffel *et al.*, 2020).

O presente estudo demonstra que a adenosina tem efeito pró tumoral em células de melanoma B16F10 e que o antagonismo causado pela cafeína previne e ou inibe o crescimento/proliferação e a capacidade metastática do melanoma murino. Primeiramente investigamos o papel da ADO nas células de melanoma *in vitro*. Nós encontramos que em concentrações crescentes de ADO, mas somente pelo período de 24h, esta molécula favorece o crescimento e a atividade metabólica das células melanoma, isto se deve ao funcionamento da cascata de ectonucleotidases presentes na membrana da célula tumoral. A enzima E-ADA é constitutivamente expressa nestas células e após ao período de exposição determinado é provável que tenham degradado a adenosina, reduzindo seus efeitos estimulatórios ao longo do tempo de exposição (Beavis *et al.*, 2013; Bours *et al.*, 2006). Vale ressaltar que esta enzima está presente em células do sistema imune, e funciona como uma controladora das ações imunomodulatórias da adenosina, regulando positiva ou negativamente esses efeitos por meio da concentração desta molécula (Zimmermann, Zebisch e Sträter, 2012).

Foi relatado que a cafeína afeta a função do ciclo celular, induz a morte celular programada ou apoptose e perturba proteínas regulatórias importantes, incluindo a proteína supressora de tumor, p53 (Ito *et al.*, 2003), além disso o seu efeito como antagonismo inespecífico aos receptores do tipo P1 pode ser demonstrado neste estudo. Ao realizarmos o ensaio de citotoxicidade para cafeína vemos que o IC50 para este composto se encontra em uma faixa de concentração a qual é normalmente alcançada em indivíduos que ingerem bebidas que a contém (Fredholm *et al.*, 1999), isto é de extrema relevância uma vez que em estudos *in vitro* geralmente se trabalha com doses altíssimas e se fazem conclusões acima de experimentos isolados não levando em consideração o corte para possível estratégia em um organismo multicelular.

Trabalhando com uma concentração de cafeína que pode ser encontrada no plasma de indivíduos após tomar um café expresso, relatamos que a atividade metabólica e o crescimento de células de melanoma metastático reduziram significativamente, também o estímulo ocasionado pela exposição a adenosina foi prevenido por este composto. A cafeína gera antagonismo não seletivo nos receptores do tipo P1, essencialmente o subtipo A2A, com função descrita de aumento do crescimento tumoral, angiogênese, proliferação e redução da vigilância imunológicas em leucócitos e linfócitos (Beavis *et*

*al.*, 2013, 2015; Ohta *et al.*, 2006).

Além dos efeitos já descritos na literatura comprovamos em nossos experimentos que a exposição a cafeína causa aumento endógeno na produção de ON, podendo estar relacionado com uma das causas de morte celular vistas aqui. O ON é uma molécula sinalizadora gerada por diversas vias, podendo interferir em processos homeostáticos e patológicos. No TMA o ON pode ser gerado tanto por células imunológicas quando pelas próprias células tumorais (Massi *et al.*, 2009). Em células de melanoma a expressão de NOS, enzimas produtoras de ON, é elevada assim como a produção desse gás pode ocorrer através da redução do nitrado a ON na pele pela exposição solar. Assim, ON é uma molécula presente ativa no TMA.

Constatamos em nosso estudo que a exposição a ADO não altera a concentração de ON de forma significativa, mas isso nos indica que possa ocorrer um equilíbrio entre estas uma vez que o ON apresenta efeitos pró tumorais em concentrações de fisiologias a pouco elevadas. Já o aumento da sua concentração, seja por liberação de granulócitos vigilantes, pela própria célula tumoral ou mesmo por tratamentos experimentais está relatada como promotora de apoptose (Yarlagadda *et al.*, 2017). Nossos resultados demonstram que a cafeína induziu aumento significativo na concentração desse composto e nos indicam uma nova via metabólica para morte celular promovida por esse composto. A estimulação de ADO ao receptor A2A pode aumentar o processo de invasão e migração celular, ambas características intrinsecamente relacionadas ao processo de metástase (Beavis *et al.*, 2013). No presente estudo podemos ver claramente a ação dessas células em migrar para espaços vagos no meio de cultura, contudo, ao tratarmos essas com CAF, essa característica foi visivelmente reduzida, indicando que mesmo em um período rápido de tempo o antagonismo do nosso composto retarda e inibe um dos processos fundamentais para a metástase tumoral.

Nestes breves experimentos podemos verificar um efeito pró-tumoral da ADO em células de melanoma metastático e que este é dependente do tempo de exposição e provavelmente da expressão e atividade da enzima E-ADA e que a cafeína causa redução da atividade metabólica e viabilidade, diminuição da proliferação por bloquear os efeitos de ADO e ou também por um mecanismo de liberação ON, além de causar redução na migração dessas células reduzindo seu potencial metastático em concentrações atingíveis em humanos.

## **CONCLUSÃO**

Existe um consenso na literatura de que os componentes do sistema purinérgico ATP, adenosina, ectoenzimas e purinoreceptores são fundamentais no TME, afetando processos diretos do crescimento do tumor e ou as funções das células imunológicas de diversas maneiras. Tomado o

conhecimento da expressão dos receptores P1 em células tumorais as estratégias para bloqueio destas vias são essenciais para o desenvolvimento de novas terapias. A cafeína largamente conhecida pelos seus efeitos psicotrópicos demonstrou em nosso estudo ser potencialmente eficaz contra o melanoma e nos apresenta o desafio de investigarmos melhor sua ação no contexto do TMA e da sinalização purinérgica. Finalmente, estes estudos fazem parte de um projeto maior que esperançosamente vai nos prover novos conhecimentos e quem sabe potenciais novas terapias anticâncer.

### AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado com fomento da Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior- CAPES.

### REFERÊNCIAS

- BEAVIS, P. A.; DIVISEKERA, U.; PAGET, C.; CHOW, M. T.; JOHN, L. B.; DEVAUD, C.; DWYER, K.; STAGG, J.; SMYTH, M. J.; DARCY, P. K. Blockade of A2A receptors potently suppresses the metastasis of CD73+ tumors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 36, p. 14711–14716, 2013.
- BEAVIS, P. A.; MILENKOVSKI, N.; HENDERSON, M. A.; JOHN, L. B.; ALLARD, B.; LOI, S.; KERSHAW, M. H.; STAGG, J.; DARCY, P. K. Adenosine Receptor 2A Blockade Increases the Efficacy of Anti-PD-1 through Enhanced Antitumor T-cell Responses. **Cancer Immunology Research**, v. 3, n. 5, p. 506 LP – 517, maio 2015.
- BLAY, J.; WHITE, T. D.; HOSKIN, D. W. The extracellular fluid of solid carcinomas contains immunosuppressive concentrations of adenosine. **Cancer research**, v. 57, n. 13, p. 2602–2605, 1997.
- BOURS, M. J. L.; SWENNEN, E. L. R.; VIRGILIO, F. DI; CRONSTEIN, B. N.; DAGNELIE, P. C. Adenosine 5' -triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacology & therapeutics**, v. 112, p. 358–404, 2006.
- BÜRK, R. R. A factor from a transformed cell line that affects cell migration. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 70, n. 2, p. 369–372, 1973.
- EMRI, G.; PARAGH, G.; TÓSAKI, Á.; JANKA, E.; KOLLÁR, S.; HEGEDÁOS, C.; GELLÉN, E.; HORKAY, I.; KONCZ, G.; REMENYIK, É. Ultraviolet radiation-mediated development of cutaneous melanoma: An update. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 185, n. March, p. 169–175, 2018.
- FREDHOLM, B. B. Adenosine Receptors as the Biochemical Target for Low Doses of Caffeine. *In: Coffee in Health and Disease Prevention*. [s.l.] Elsevier, 2015. p. 831–834.

- FREDHOLM, B. B.; BÄTTIG, K.; HOLMÉN, J.; NEHLIG, A.; ZVARTAU, E. E. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. **Pharmacological reviews**, v. 51, n. 1, p. 83–133, 1999.
- FREDHOLM, B. B.; IJZERMAN, A. P.; JACOBSON, K. A.; KLOTZ, K.-N.; LINDEN, J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors. **Pharmacological Reviews**, v. 53, n. 4, p. 527 LP – 552, 1 dez. 2001.
- GARCIA, A. E.; MADA, S. R.; RICO, M. C.; CADENA, R. A. DELA; KUNAPULI, S. P. Clopidogrel, a P2Y<sub>12</sub> receptor antagonist, potentiates the inflammatory response in a rat model of peptidoglycan polysaccharide-induced arthritis. **PLoS One**, v. 6, n. 10, p. e26035, 2011.
- ITO, K.; NAKAZATO, T.; MIYAKAWA, Y.; YAMATO, K.; IKEDA, Y.; KIZAKI, M. Caffeine induces G<sub>2</sub>/M arrest and apoptosis via a novel p53-dependent pathway in NB4 promyelocytic leukemia cells. **Journal of cellular physiology**, v. 196, n. 2, p. 276–283, 2003.
- LIU, J.; SHEN, B.; SHI, M.; CAI, J. Higher caffeinated coffee intake is associated with reduced malignant melanoma risk: a meta-analysis study. **PloS one**, v. 11, n. 1, p. e0147056, 2016.
- LOFTFIELD, E.; FREEDMAN, N. D.; GRAUBARD, B. I.; HOLLENBECK, A. R.; SHEBL, F. M.; MAYNE, S. T.; SINHA, R. Coffee drinking and cutaneous melanoma risk in the NIH-AARP diet and health study. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 107, n. 2, 2015.
- MASSI, D.; NISI, M. C. DE; FRANCHI, A.; MOURMOURAS, V.; BARONI, G.; PANELOS, J.; SANTUCCI, M.; MIRACCO, C. Inducible nitric oxide synthase expression in melanoma: implications in lymphangiogenesis. **Modern Pathology**, v. 22, n. 1, p. 21–30, 2009.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.
- OHTA, A.; GORELIK, E.; PRASAD, S. J.; RONCHESE, F.; LUKASHEV, D.; WONG, M. K. K.; HUANG, X.; CALDWELL, S.; LIU, K.; SMITH, P. A<sub>2A</sub> adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 35, p. 13132–13137, 2006.
- SCHEFFEL, T. B.; GRAVE, N.; VARGAS, P.; DIZ, F. M.; ROCKENBACH, L.; MORRONE, F. B. Immunosuppression in Gliomas via PD-1/PD-L1 Axis and Adenosine Pathway. **Frontiers in oncology**, v. 10, p. 3397, 2020.
- SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. **Cancer statistics, 2017 CA: a cancer. J Clin** 67: 7–30, 2017.
- VIJAYAN, D.; YOUNG, A.; TENG, M. W. L.; SMYTH, M. J. Targeting immunosuppressive adenosine in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 17, p. 709, out. 2017.
- VIRGILIO, F. DI; CHIOZZI, P.; FERRARI, D.; FALZONI, S.; SANZ, J. M.; MORELLI, A.; TORBOLI, M.; BOLOGNESI, G.; BARICORDI, O. R. Nucleotide receptors: an emerging family of

regulatory molecules in blood cells. **Blood**, v. 97, n. 3, p. 587–600, 2001.

WU, S.; HAN, J.; SONG, F.; CHO, E.; GAO, X.; HUNTER, D. J.; QURESHI, A. A. Caffeine intake, coffee consumption, and risk of cutaneous malignant melanoma. **Epidemiology (Cambridge, Mass.)**, v. 26, n. 6, p. 898, 2015.

YARLAGADDA, K.; HASSANI, J.; FOOTE, I. P.; MARKOWITZ, J. The role of nitric oxide in melanoma. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1868, n. 2, p. 500–509, 2017.

YOUNG, A.; MITTAL, D.; STAGG, J.; SMYTH, M. J. Targeting cancer-derived adenosine: new therapeutic approaches. **Cancer discovery**, v. 4, n. 8, p. 879–888, 2014.

ZAREK, P. E.; HUANG, C.-T.; LUTZ, E. R.; KOWALSKI, J.; HORTON, M. R.; LINDEN, J.; DRAKE, C. G.; POWELL, J. D. A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. **Blood**, v. 111, n. 1, p. 251–259, 2008.

ZIMMERMANN, H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 362, n. 4–5, p. 299–309, 2000.

ZIMMERMANN, H.; ZEBISCH, M.; STRÄTER, N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. **Purinergic signalling**, v. 8, n. 3, p. 437–502, 2012.